

# Pituitary tumor transforming gene 1 enhances proliferation and suppresses early differentiation of keratinocytes

著者	石塚 洋典
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 6606, 2013.3.25 Offprint. Originally published in: Journal of investigative dermatology, v. 132, issue 7, pp. 1775-1784, 2012 Includes supplementary treatise Includes bibliographical references (p. [9-10])
発行年	2013
その他のタイトル	Pituitary tumor transforming gene 1は表皮角化細胞の増殖を促進し，初期分化を抑制する
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/120464">http://hdl.handle.net/2241/120464</a>

氏 名 (本籍)	いし つか よう すけ 石 塚 洋 典 (茨 城 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6606 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	<b>Pituitary tumor transforming gene 1 enhances proliferation and suppresses early differentiation of keratinocytes</b> (Pituitary tumor transforming gene 1 は表皮角化細胞の増殖を促進し、初期分化を抑制する)
主 査	筑波大学教授 博士 (理学) 入 江 賢 児
副 査	筑波大学教授 博士 (医学) 関 堂 充
副 査	筑波大学教授 博士 (医学) 原 尚 人
副 査	筑波大学准教授 博士 (医学) 和 田 哲 郎

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

表皮皮膚は生理的再生系組織であり、物理的バリアとして生命活動の恒常性維持に寄与している。表皮は皮膚の最外層に存在し、重層する表皮角化細胞より形成される。角化細胞は、表皮基底層から上層に遊走するに従って次第に分化し増殖能を失い、最終的には死細胞の層である角層を形成する。この過程においては増殖と分化は非常に厳密に制御されていると考えられており、現在まで様々な因子の関与が明らかになってきている。近年、普遍的転写因子 Pituitary tumor transforming gene-1 (以下 PTTG1) は、細胞周期制御機能や転写活性能によって、種々の細胞の増殖や分化過程において重要な役割を担っていることが明らかにされてきている。また、PTTG1 は細胞周期の G2/M 期にかけて高発現し、分裂中期において姉妹染色体の分離を制御する securin 蛋白としても知られている。しかし、表皮角化細胞における PTTG1 の役割はまだ解明されていない。そこで、表皮角化細胞の増殖と分化における PTTG1 の役割を解明するために、培養表皮角化細胞を用いて、PTTG1 を過発現あるいは発現抑制することにより以下の実験を試みられた。

### (対象と方法)

1. 表皮角化細胞における PTTG1 発現様式が、正常の皮膚組織免疫組織染色、カルシウム依存性に分化させた新生マウス表皮角化細胞 (NMK) を用いて検討された。
2. PTTG1 の発現状態による三次元 (重層) 培養系における表現型の変化が検討された。PTTG1 を構成的過発現あるいは内因性 PTTG1 を発現抑制させた表皮角化細胞の細胞株である HaCaT 細胞と正常表皮角化細胞 (NHK) を、I 型コラーゲン基質中に埋没培養したヒト正常線維芽細胞上で培養、重層化させた。これらの細胞株中で、重層上皮様組織の厚さ、重層上皮様組織を表皮角化細胞の分化マーカー (keratin14 (基底層ケラチン)、keratin1/keratin10 (初期分化マーカー)、loricrin (最終分化マーカー)、増殖マーカー (Ki67) の免疫組織染色が検討された。
3. 表皮角化細胞の二次元 (単層) 培養による検討がされた。NMK 細胞に PTTG1 を過発現させ、カルシ

ウム濃度依存性に分化させ、keratin5（基底層ケラチン）、keratin1/keratin10（初期分化マーカー）の発現が検討された。PTTG1を構成的過発現あるいは内因性 PTTG1を発現抑制させた HaCaT 細胞の増殖能が評価された。PTTG1を構成的過発現あるいは内因性 PTTG1を発現抑制させた HaCaT 細胞と NHK 細胞で細胞周期関連分子である cyclin A/B1/D1、cyclin dependent kinase 1（CDK1）、PTTG1の転写標的である c-myc の発現が検討された。PTTG1を過発現させた NMK 細胞で cyclin B1、CDK1、c-myc の発現が検討された。

#### （結果）

ヒト正常表皮の免疫組織染色により PTTG1 は表皮基底層と傍基底層の角化細胞の核と細胞質に発現していることが明らかにされた。また新生マウス表皮角化細胞の培養から、カルシウム依存性に分化させた場合に PTTG1 の発現はタンパク質、mRNA レベルにおいて、未分化状態に有意であることが示された。

PTTG1 の発現状態による三次元（重層）培養系において、PTTG1 発現量に応じて重層上皮様組織の厚さが増減した。また、PTTG1 過発現により初期分化マーカーに染色されない未分化な層が増加していたものの、最終分化には明らかな変化はないことが明らかにされた。一方、PTTG1 の発現抑制による分化形態の明らかな変化はなかった。さらに、増殖マーカーの発現は PTTG1 の発現量に応じて増減した。

新生マウス表皮角化細胞の二次元（単層）培養においては、PTTG1 の過発現により、カルシウム濃度の変化に伴う初期分化マーカーの発現が、mRNA とタンパク質レベルとともに抑制された。また、HaCaT 細胞の二次元（単層）培養における検討では、PTTG1 の発現量に応じて細胞増殖能が増減した。細胞周期関連分子について、PTTG1 の発現量に応じてヒト角化細胞においては cyclin A/ B1、CDK1 が有意差をもって増減していた一方、cyclin D1 には有意差がなかった。また、新生マウス角化細胞の培養においては、PTTG1 の過発現により mRNA とタンパク質レベルでの cyclinB1, CDK1, c-myc の上方制御が見られた。

#### （考察）

PTTG1 の発現量に応じて表皮角化細胞の増殖能が亢進した結果、初期分化が抑制された。また、細胞周期関連分子である cyclin B1、CDK1、c-myc の発現量も変化していた。c-myc は既に同定されている PTTG1 の転写標的であるが、表皮角化細胞においても同様の機序を介して発現が制御されと考えられた。一方、細胞周期中で G2/M 期に高発現する cyclin A/B1 に有意差があったものの、G1 期に主として発現する cyclin D1 に有意差がなかったことから、PTTG1 は特に G2/M 期にかけての細胞周期の進行に重要な役割を有するものと考えられた。これは、分裂中期において姉妹染色体の分離の制御を行う securin 蛋白としての機能を強く反映した結果かもしれないと考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、PTTG1 は表皮角化細胞の増殖能維持において重要な役割を有することが明らかにされ、尋常性乾癬や皮膚有棘細胞癌といった表皮角化細胞の増殖と分化異常を来す病態においても PTTG1 が何らかの役割を有していることが示唆された。これらの研究成果は、表皮角化細胞の増殖と分化における PTTG1 の役割を解明する上で重要な知見であり、高く評価される。

平成 25 年 1 月 11 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。